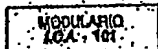


823 PCT



Rec'd PCT/PTO 12

2005-1-4-7

EP03/12638

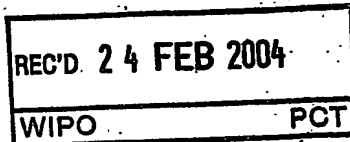
10/534864

Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:

Invenzione Industriale

N.

MI2002 A 002412

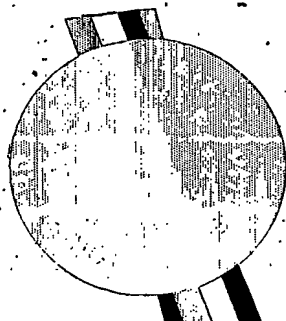


*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il 28 NOV. 2003

Per IL DIRIGENTE
Paola Giuliano
D.ssa Paola Giuliano



BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA DEI TUMORI
 Residenza Milano codice 043763501155
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Bianchetti Giuseppe ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza Bianchetti Bracco Minoja s.r.l.
 via Rossini n. 8 città Milano cap 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/sci) _____ gruppo/sottogruppo _____

"Peptidi immunogeni di PTPRK"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) Castelli Chiara 3) _____
 2) Parmiani Giorgio 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione	tipo di priorità	numero di domanda	data di deposito	allegato S/R
1) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>
2) _____	_____	_____	____/____/____	<input type="checkbox"/>

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI



DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1)	<u>2</u>	<u>PROV</u>	n. pag. <u>38</u>	riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)
Doc. 2)	<u>2</u>	<u>PROV</u>	n. tav. <u>07</u>	disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)
Doc. 3)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		lettera d'incarico, prot. <u>STUDIO DI CURA DEI TUMORI</u>
Doc. 4)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		designazione inventore
Doc. 5)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		documenti di priorità con traduzione in italiano
Doc. 6)	<u>0</u>	<u>RIS</u>		autorizzazione o atto di cessione
Doc. 7)	<u>0</u>			nominativo completo del richiedente

SCIoglimento RISERVE

Data _____ N° Protocollo _____

confronta singole priorità

8) attestati di versamento, totale Euro Duecentonovantuno/80# obbligatorio

COMPILATO IL 14/11/2002

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

Banfi Paolo

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANO

MILANO

codice 15

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

MI2002A 002412

Reg. A.

DUEMILADUE

QUATTORDICI

NOVEMBRE

L'anno

il giorno

00

del mese di

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda per depositare

00 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto soprariportato.

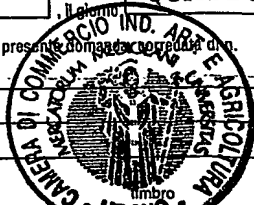
I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

Il rappresentante pur informato del contenuto della circolare n. 423 del 01/03/2001 effettua il deposito con riserva di lettera di incarico.

UFFICIALE ROGANTE

IL CORTONESTI

IL DEPOSITANTE



RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA MI2002A 002412

REG. A

DATA DI DEPOSITO

14/11/2002

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

D. TITOLO

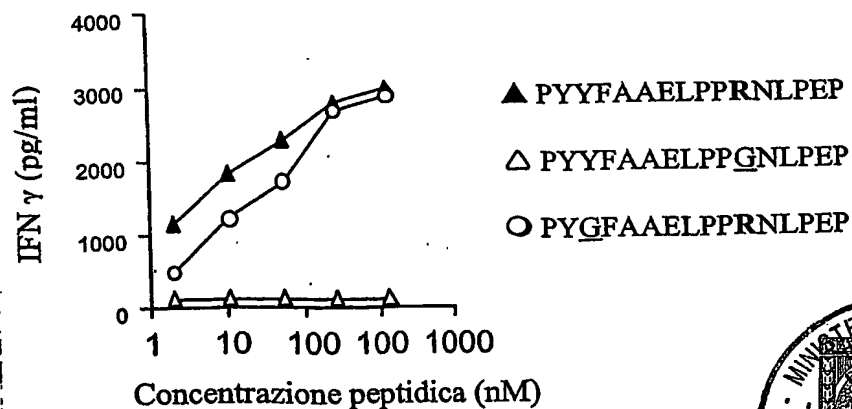
"Peptidi immunogeni di PTPRK"

L. RIASSUNTO

Sono descritti un peptide immunogeno di PTPRK, anticorpi contro lo stesso, molecole di acido nucleico che lo codificano, composizioni terapeutiche e diagnostiche contenenti lo stesso e il loro utilizzo nella diagnosi o trattamento di pazienti affetti da tumore, in particolare di pazienti affetti da melanoma esprimente PTPRK.

M. DISEGNO

FIGURA 6



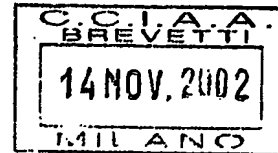
23 M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

/mc **"PEPTIDI IMMUNOGENI DI PTPRK"**

a nome : **ISTITUTO NAZIONALE PER LO STUDIO E LA CURA
DEI TUMORI**

con sede in: Milano

MI 2002 A 0 0 2 4 1.2



* * *

La presente invenzione riguarda peptidi immunogeni derivati dalla proteina PTPRK (Receptor-Like Protein Tyrosine Phosphatase Kappa) e il loro utilizzo nella diagnosi e nel trattamento preventivo o terapeutico dei tumori. Più precisamente l'invenzione riguarda un epitopo antigenico ristretto a HLA di classe II riconosciuto da cellule T CD4+ e il suo uso nella diagnosi e immunoterapia di pazienti affetti da melanoma esprimente la proteina PTPRK mutata.

Background dell'invenzione

L'identificazione di antigeni associati a tumore in grado di indurre risposte tumore-specifiche mediate da cellule T ha reso possibile un nuovo approccio immunologico al trattamento dei tumori. La maggior parte degli antigeni associati a tumore finora identificati sono riconosciuti da linfociti T citotossici (CTL) ristretti a HLA di classe I, nonostante le cellule T CD4+, che riconoscono antigeni associati a HLA di classe II, abbiano un ruolo determinante nell'induzione e nel mantenimento di una risposta immunitaria efficace nelle infezioni virali e nei tumori. La mancanza di epitopi tumore-specifici in grado di evocare una risposta "helper" mediata da cellule T e la natura "self" della maggior parte degli antigeni associati a tumore ristretti a HLA di classe I costituiscono i principali fattori limitanti l'efficacia

terapeutica dei programmi di vaccinazione di pazienti tumorali. Pertanto, la caratterizzazione di nuovi antigeni tumore-specifici ristretti a MHC di classe II è di cruciale importanza per ottenere vaccini peptidici maggiormente efficaci. Tuttavia, i meccanismi coinvolti nella presentazione e processamento di antigeni MHC di classe II appaiono piuttosto complessi e non sono ancora completamente chiariti. Difficoltà tecniche hanno finora impedito l'identificazione di antigeni tumorali ristretti a HLA di classe II, riducendo così la disponibilità di epitopi helper specifici per il melanoma, che rappresenta il tumore umano maggiormente immunogeno.

La proteina PTPRK appartiene alla famiglia delle proteine transmembrana di tipo recettoriale ed è caratterizzata dalla presenza, nella sua porzione extracellulare, di ripetizioni di fibronectina-tipo III e di domini di immunoglobulina e meprina/A5/ μ (MAM) (30,31). PTPRK è espressa in tessuti normali quali milza, prostata, ovario e in linee cellulari di cheratinociti ma non in PBL né in linee cellulari ematiche (24). Anche se la precisa funzione fisiologica di PTPRK non è ancora ben chiara, le sue caratteristiche strutturali e la capacità di mediare interazioni omofile tra cellule, insieme all'osservazione che l'espressione di PTPRK è indotta dalla densità cellulare, suggeriscono un ruolo cruciale per questa proteina nella regolazione del contatto cellula-cellula (30). Inoltre si è recentemente dimostrato che nell'uomo PTPRK co-localizza ed è associata alla catenina β e γ nell'area di contatto di cellule adiacenti (25). Ciò suggerisce il coinvolgimento della proteina nella regolazione negativa di eventi indotti da tirosin-chinasi a livello delle giunzioni cellulari, probabilmente attraverso la defosforilazione della catenina β e γ . Questo, insieme alla scoperta che il gene PTPRK umano

mappa nella presunta regione dei geni oncosoppressori 6q22.2-q22.3 (31,32), frequentemente deleta nei melanomi (33,34), supporta l'ipotesi che la perdita di espressione o mutazioni nei domini funzionali della proteina PTPRK possono direttamente intaccare il fenotipo di cellule a crescita normale e avere un ruolo nella trasformazione e nello sviluppo tumorale.

Descrizione dell'invenzione

Allo scopo di identificare antigeni di melanoma ristretti a HLA di classe II, si è studiata la risposta anti-tumorale CD4+ di un paziente affetto da melanoma, con prognosi favorevole e senza più segni di malattia a distanza di nove anni dalla resezione chirurgica delle metastasi linfonodali. L'evoluzione clinica positiva è stata associata ad una risposta anti-tumorale mediata da CD8 forte e persistente, diretta contro TRP-2 e l'antigene di differenziazione gp100. Poiché le cellule T CD4 sono notoriamente essenziali per la generazione e il mantenimento di cellule CD8 T, si è indagato se il paziente in esame avesse sviluppato anche una risposta tumore-specifica mediata da CD4. Linfociti T ottenuti da linfonodi infiltrati da tumore sono stati ripetutamente stimolati in vitro con il tumore autologo e sono stati generati cloni di cellule T attraverso diluizione limitante. I cloni di cellule T CD4+ che riconoscevano il tumore autologo in modalità HLA-DR-ristretta sono stati caratterizzati in vitro per la loro fine specificità e utilizzati come sonde cellulari in un approccio genetico mirato alla definizione della natura molecolare dell'antigene riconosciuto. Lo screening di una libreria d'espressione di cDNA costruita usando come stampo RNA di melanoma autologo ha permesso di identificare il gene di PTPRK come responsabile della codifica dell'antigene riconosciuto dai cloni CD4+ melanoma-specifici. L'mRNA di

PTPRK clonato da cellule di melanoma conteneva una mutazione non conservativa Gly→Arg nel quarto dominio fibronectina III-simile della proteina. Questa sostituzione amminoacidica genera un epitopo per cellule T che viene presentato da HLA-DRβ1*1001 ed è riconosciuto dai cloni di cellule T CD4+ usati per lo screening della libreria di cDNA tumorale e da tutti i diversi cloni isolati dai linfonodi infiltrati da tumore dello stesso paziente. Tale epitopo antigenico corrisponde alla regione 667-682 di PTPRK Gly677→Arg ed ha sequenza PYYFAAELPPRNLP (SEQ ID N. 1).

L'invenzione è pertanto diretta al peptide immunogeno SEQ ID N:1 ed al suo uso nella generazione di anticorpi e/o di cellule T helper o citotossiche, più in generale nell'induzione di una risposta immunitaria tumore-specifica, per applicazioni diagnostiche o terapeutiche, in particolare per la diagnosi, prevenzione o immunoterapia di tumori esprimanti PTPRK_{Gly677→Arg}.

Il peptide dell'invenzione può essere preparato in diversi modi. Per esempio, può essere sintetizzato in soluzione o su supporto solido secondo tecniche convenzionali, eventualmente utilizzando sintetizzatori automatici. I principi e i metodi per la sintesi peptidica sono noti all'esperto del settore e sono per esempio descritti in Stewart e Young, (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2nd ed., Pierce Chemical Co.; Tam et al., *J. Am. Chem. Soc.*, (1983) 105:6442; Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meinenhofer eds. Academic Press, (1979) New York, pp. 1-284, qui incorporati per riferimento.

Per l'uso in terapia, il peptide dovrà essere opportunamente formulato assieme ad eccipienti farmaceuticamente accettabili. Formulazioni idonee al trattamento preventivo o terapeutico possono essere somministrate per via orale o parenterale, preferibilmente per via sottocutanea o intramuscolare.



conterranno una quantità efficace di peptide. Tale quantità dovrà essere in grado di scatenare una risposta immunitaria umorale o cellulo-mediata contro il tumore e potrà variare in funzione delle condizioni generali di salute del soggetto, dello stato di avanzamento della patologia da trattare o di altri fattori. Secondo una realizzazione preferita, il peptide dell'invenzione viene somministrato in forma di vaccino per il trattamento preventivo di soggetti con predisposizione al melanoma o per il trattamento terapeutico di pazienti affetti da melanoma. Il vaccino può essere somministrato secondo uno schema a dosaggio singolo o multiplo, a dosi successive a diversi intervalli di tempo, necessarie a mantenere o rafforzare la risposta immunitaria. L'immunogenicità del peptide può essere aumentata mediante cross-linking o coupling con carrier immunogenici, o con l'impiego di opportuni adiuvanti. Inoltre il peptide può essere coniugato con lipidi, residui glicosidici o altri peptidi in modo da aumentarne l'affinità per molecole HLA o la biodisponibilità.

L'invenzione comprende inoltre anticorpi policlonali o monoclonali, loro frammenti o derivati quali Fab, Fv o scFv, in grado di riconoscere e legare il peptide SEQ ID N: 1. Gli anticorpi possono essere utilizzati nell'immunoterapia del tumore o in tecniche immunodiagnostiche per la caratterizzazione dei tumori esprimenti PTPRK_{Gly677→Arg}.

In un altro aspetto, l'invenzione è diretta a cellule T CD4+ che riconoscono specificamente un tumore esprimente PTPRK_{Gly677→Arg} e al loro utilizzo nell'induzione di una risposta immunitaria cellulo-mediata contro lo stesso tumore. Tali cellule possono essere isolate da PBMC del soggetto da sottoporre a trattamento e attivate in vitro con il peptide SEQ ID N. 1,

eventualmente mediante aggiunta di citochine, o con cellule presentanti lo stesso peptide in associazione a molecole HLA di classe II, quali APC (cellule presentanti l'antigene) esprimenti l'allele HLA-DR β 1*1001 caricate con il peptide. Le APC possono essere modificate geneticamente, per esempio mediante trasfezione con opportuno vettore virale o retrovirale, in modo da esprimere lo specifico allele HLA o il peptide o un suo precursore. Le cellule APC così modificate possono essere usate per attivare cellule T *in vitro* e o *in vivo*. Cellule T attivate *in vitro* possono successivamente essere reintrodotte nel paziente per prevenire l'insorgenza, arrestare la crescita o ridurre la quantità di cellule tumorali. Prima della loro reintroduzione nel paziente, i linfociti possono essere purificati, per esempio mediante colonna d'affinità utilizzando un anticorpo contro CD4 o altri marker.

Costituiscono ulteriori oggetti dell'invenzione una sequenza di DNA codificante l'epitopo di PTPRK_{Gly677→Arg} qui descritto, preferibilmente la sequenza CCGTATTACTTTGCTGCAGAACTCCCCCGAGAAACCTACCTGAGCCT (SEQ ID N. 2), un vettore e una cellula ospite comprendenti tale sequenza. Molecole di DNA contenenti l'intera sequenza codificante il peptide, o una sua parte, e i relativi costrutti genici possono essere utilizzati nella vaccinazione di soggetti a rischio di sviluppo di tumore, in particolare melanoma, o di pazienti affetti da tumore. L'immunizzazione con DNA può essere effettuata seguendo tecniche note (Donnelly J.J. et al., 1994, The immunologist 2:1). E' preferita la via di somministrazione intramuscolare, ma possono essere utilizzate anche la via parenterale e mucosale (PNAS 1986, 83, 9551; WO90/11092). Il DNA può inoltre essere adsorbito su particelle d'oro per somministrazione transcutanea mediante apparecchiatura biolistica (Johnston, 1992 Nature, 356,

152).

Oltre che per gli usi terapeutici sopra descritti, le molecole di acido nucleico contenenti l'intera sequenza di DNA codificante il peptide, o una sua parte, e il peptide stesso possono essere utilizzati nella diagnosi di melanomi che esprimono PTPRK_{Gly677→Arg}, per esempio mediante analisi di PCR o attraverso immunosaggi in cui vengono utilizzati anticorpi epitopo-specifici. Inoltre, complessi formati dal peptide SEQ ID N. 1 e da molecole HLA-DRβ1*1001 possono essere utilizzati per monitorare *in vitro* o *ex vivo* la risposta immune di soggetti vaccinati con lo stesso peptide.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1

Caratterizzazione funzionale del clone di linfocita T antimelanoma TB515.

(A) Sensibilità delle cellule Me15392 e LCL15392 marcate con ⁵¹Cr alla lisi da parte del clone TB515: il rilascio di ⁵¹Cr è stato misurato dopo 5 ore. Il saggio è stato condotto in assenza (■) o in presenza (▲) dell'anticorpo anti-HLA-DR L243. (B) Saggio di rilascio di citochine: il clone TB515 è stato incubato per una notte con tumore autologo o con LCL15392 in un rapporto cellulare di 1:1 in presenza o in assenza di L243. Il surnatante è stato raccolto e il contenuto di INF-γ, GM-CSF, TNF-α e IL-2 è stato esaminato con un saggio ELISA disponibile in commercio.

Deviazione Std ≤ 5%.

Figura 2

Il DNA complementare del clone#11 codifica per l'antigene riconosciuto da TB515: (A) CIITA⁺293 sono state trasfettate con cDNA#11 in

pEAK8.5-II da solo o insieme a pcDNA3.1-DRB1*0102 o pcDNA3.1-DRB1*1001, rispettivamente. Le CIITA⁺293 trasfettate con solo pcDNA3.1-DRB1*0102 o pcDNA3.1-DRB1*1001 e CIITA⁺293 cotrasfettate con pcDNA3 ricombinante codificante la proteina fluorescente verde (GFP) e pcDNA3.1-DRB1*1001 sono state usate come controllo negativo. (B) il cDNA#11 è stato subclonato in pcDNA3.1 e cotrasfettato con pcDNA3.1-DRB1*1001 in CIITA⁺293. Il clone TB515 (1x10⁵ linfociti per pozzetto) è stato aggiunto a ciascun trasfettante e dopo 24 h i surnatanti sono stati raccolti e il contenuto di IFN- γ valutato mediante ELISA. In entrambi i pannelli, Me15392 è stato usato come controllo positivo. I trasfettanti sono stati valutati per la capacità di indurre il rilascio di IFN- γ da parte di TB515.

Figura 3

(A) *Espressione dell'mRNA di PTPRK in cellule Me15392.*

10 μ g di mRNA poli(A)⁺ ottenuto da Me15392 sono stati analizzati con Northern blot. L'ibridazione è stata condotta utilizzando una miscela equimolare di tre sonde marcate con ³²P che coprono le regioni extracellulare, transmembrana e intracellulare del cDNA di PTPRK (vedere materiali e metodi per il dettaglio). Le corsie sono state caricate con una quantità paragonabile di mRNA come appurato mediante ibridazione col gene "housekeeping" β -actina. Campioni: Me15392, mRNA ottenuto dalle cellule di melanoma 15392 coltivate; PBL, pool di mRNA di 4 donatori sani; A431, mRNA di linea cellulare di tumore dell'epidermide. (B) *Analisi di RT-PCT del profilo di espressione di mRNA di PTPRK.* La regione che attraversa il dominio fosfatasico intracellulare è stata amplificata con i primers F3/R8 che generano una specifica banda di amplificazione di 650 bp. Le condizioni di



reazione sono state fissate all'interno dell'intervallo lineare di amplificazione del DNA. La quantità di stampo è stata aggiustata in modo da ottenere livelli comparabili di β -actina, permettendo così il confronto diretto di PTPRK amplificato tra i campioni esaminati. Come esempio rappresentativo si riporta la valutazione dell'espressione di PTPRK mediante analisi RT-PCR di 5 su 10 linee cellulari di melanoma esaminate: 4 linee metastatiche (Me15392, Me335, Me337 e Me349) e una linea cellulare di melanoma primario (Me366). Sono inoltre inclusi un pool di PBL da 4 donatori sani (PBL) e melanociti normali (FM2093) sono inoltre inclusi.

La figura è rappresentativa di 3 esperimenti indipendenti.

Figura 4

Caratterizzazione del cDNA#11. cDNA#11 e i relativi minigeni sono rappresentati come riquadri allineati a una struttura schematica della proteina PTPRK. I riquadri neri in ciascun minigene indica la posizione di un codone ATG in fase con la ATG iniziale del gene di lunghezza intera (GenBank NM_002844). E' indicato il nucleotide mutato (g→a) presente nella posizione 2249. I minigeni sono stati sintetizzati mediante amplificazione per PCR di cDNA#11 usando un primer forward identico (F2) accoppiato a diversi primer reverse "nested" che mappano a valle della mutazione (primer reverse EPR1, EPR2, EPR2WT e EPR3 indicati dalle frecce).

I minigeni sono stati clonati in un vettore di espressione pcDNA3/TOPO e poi cotrasfettati con pcDNA3-DRB1*1001 o pcDNA3-DRB1*0102 nelle cellule CIITA⁺293. Il clone TB515 (1×10^5 cellule per pozzetto) è stato aggiunto a ciascun trasfettante e dopo 24 ore i surnatanti sono stati esaminati per il contenuto di IFN- γ mediante ELISA. Nella tabella:

+, riconoscimento positivo da parte di TB515; -, nessun riconoscimento da parte di TB515. Il minigene EP2wt conteneva il nucleotide non mutato (g). La sequenza aminoacidica al fondo della figura è stata dedotta dal sequenziamento del cDNA#11. Abbreviazioni: LS, leader sequence; MAM, motivo meprin/A5/R-PTP μ ; Ig, dominio di tipo immunoglobulinico; FNIII, dominio simile a fibronettina di tipo III; TM, transmembrana; PTP, dominio di tirosin-fosfatasi; R, arginina derivante dalla mutazione nucleotidica g \rightarrow a.

Figura 5

Identificazione dell'epitopo TB515. (A, B, C) cellule LCL15392 (5.0×10^3 cellule per pozzetto) pulsate per 2 ore a 37°C con i peptidi sintetici a diverse concentrazioni sono state usate per stimolare i linfociti T TB515. I TB515 (5×10^3 cellule per pozzetto) sono stati aggiunti, dopo 18 ore si è raccolto il terreno e si è misurato IFN- γ con ELISA. Risultati identici sono stati ottenuti usando LCL3700, che condivide solo il DRB*1001 con pt15392. (D) 5×10^3 cellule LCL15392 sono state incubate con varie concentrazioni del peptide di competizione per 15 min. I peptidi di competizione comprendevano: PYGFAAELPPRNLPEP, modificato in posizione 3, il wild type PYYFAAELPPGNLPEP, e il peptide di legame di HLA-A3 ILRGSVAHK che è stato usato come controllo negativo. Il peptide PYYFAAELPPRNLPEP è stato quindi aggiunto a 100 nM. Dopo un'ora di ulteriore incubazione a 37°C, TB515 è stato aggiunto (5×10^3 cellule per pozzetto), dopo 18 ore il terreno è stato raccolto e IFN- γ misurato con ELISA. Risultati identici sono stati ottenuti usando LCL3700 che condivide solo DRB*1001 con pt15392. L'amminoacido mutato è in grassetto; gli amminoacidi sostituiti sono sottolineati.

Figura 6

Specificità peptidica del clone TB48 di linfociti T. Cellule LCL15392 (5.0×10^3 cellule per pozzetto) pulsate per 2 ore a 37°C con i peptidi sintetici a diverse concentrazioni sono state usate per stimolare TB48. Il clone TB48 (5×10^3 cellule per pozzetto) è stato aggiunto e dopo 18 ore il terreno è stato raccolto e IFN- γ misurato con ELISA. Risultati identici sono stati ottenuti usando LCL3700, che condivide solo DRB*1001 con pt15392.

Figura 7

Immunità specifica per l'epitopo PTPRK in PBMC di pt 15392. PBMC di pt15392, ottenuti durante un periodo senza segni di malattia di 12 mesi dall'intervento chirurgico, sono stati stimolati *in vitro* con il peptide mutato PYYFAAELPPRNLPEP. Alla fine della terza settimana di coltura le linee cellulari T generate sono state esaminate con saggio ELISPOT per la capacità di rilasciare IFN- γ in risposta a stimolazione con tumore autologo o con il peptide, in presenza e in assenza dell'anticorpo HLA-DR L243. Le cellule T sono state incubate con (1) terreno, (2) LCL15392, (3) LCL15392 pulsate con $4 \mu\text{g}$ di PYYFAAELPPRNLPEP, (4) LCL15392 pulsate con $4 \mu\text{g}$ di PYYFAAELPPRNLPEP e incubate con $10 \mu\text{g/ml}$ di Ab L243 anti- HLA-DR, (5) LCL15392 pulsate con $2 \mu\text{g}$ di PYYFAAELPPRNLPEP, (6) LCL 15392 pulsate con $2 \mu\text{g}$ di PYYFAELPPRNLPEP e incubate con $10 \mu\text{g/ml}$ di anticorpo anti-HLA DR L243, (7) LCL15392 pulsate con $4 \mu\text{g}$ del peptide PYYFAAELPPG~~N~~LPEP wild type, (8) Me15392 autologhe, (9) Me15392 autologhe incubate con anticorpo L243 anti-HLA DR.

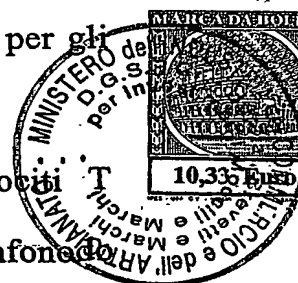
⁷Abbreviazioni: pt15392, paziente 15392; LN, linfonodo, gp100, glicoproteina 100; TRP-2, proteina correlata a tirosinasi 2; PTPRK, receptor-like

tyrosine phosphatase kappa; RT-PCR, reazione a catena della polimerasi con trascrizione inversa; CIITA, Transattivatore di Classe II; Ii, catena invariante; GFP, proteina fluorescente verde; LCL, linea cellulare B trasformata con EBV linfoblastoide, MTS, segnale di trasporto melanosomiale; MAM, motivo muprina/A5/PTPR μ ; E, cellula effettrice; T, cellula target; TCR, recettore di cellule T.

MATERIALI E METODI

Linee cellulari. Il decorso clinico del paziente (pt) 15392 (HLA-A*0301, B*40012, B*1402, C*0602, C*8002, DRB1*0102, DRB1*1001), e la stabilizzazione *in vitro* della linea cellulare di melanoma Me15392 sono già stati descritti (16). Mediante analisi della superficie cellulare le cellule Mr15392 risultavano positive per HLA di classe I ed esprimevano costitutivamente HLA di classe II DR, DP, ma non DQ. LCL15392 e LCL3700 sono linee cellulari B trasformate con EBV ottenute da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC) di pt15392 e rispettivamente di un donatore sano. LCL3700 condivide con pt15392 il solo DRB1*1001. Cellule 293-EBNA (wt293) (Invitogren, CA 9200, USA) e cellule 293-EBNA Transattivatore⁺ di classe II (CIITA⁺293) sono state mantenute in terreno DMEM (Euroclone, Europe, TQ4 5ND Devon, UK) con 10% FCS. Le cellule CIITA⁺293 sono state ottenute mediante trasduzione di cellule wt293 con il vettore retrovirale codificante CIITA. Le cellule CIITA⁺293 sono state immunoselezionate usando L243, un anticorpo monoclonale specifico per gli alleli HLA-DR.

Generazione di cloni di cellule T tumore-specifici. Linfoцитi T infiltranti il tumore (TIL), raccolti da una lesione metastatica di linfoma



chirurgicamente rimossa dal pt 15392 nel 1991, sono stati isolati mediante centrifugazione in gradiente di densità. Le cellule T sono state stimulate due volte *in vitro* con cellule di tumore autologo irradiato in terreno RPMI addizionato di IL-2 umana ricombinante 300 IU/mL (EuroCetus, Amsterdam, The Netherlands) e di siero umano AB raggruppato al 10%. Dopo 3 settimane di cultura *in vitro* le cellule T sono state clonate attraverso diluizione limitante e i cloni esaminati per crescita al giorno 15. La specificità dei cloni delle cellule T in crescita è stata analizzata in un saggio di rilascio di ^{51}Cr . 140 cloni indipendenti mostravano un'attività litica mediata da TCR contro il tumore autologo. 40 cloni mostravano un riconoscimento del tumore autologo ristretto ad HLA-DR e sono stati selezionati per ulteriori analisi. Per confermare la natura clonale e per classificare i cloni con identica specificità TCR, il repertorio TCR di ciascun clone è stato esaminato mediante TCR a trascrizione inversa (RT), usando un pannello di primers specifici per TCR AV e TCRBV come descritto in precedenza (17).

Saggio di rilascio di citochine. I linfociti sono stati seminati (5×10^3 in 50 μl) in piastre con fondo a U da 96 pozzetti a 10^4 /pozzetto di cellule di melanoma o con 5×10^3 LCL autologhe fissate per 2 ore a 37°C con diverse dosi di peptidi, in un volume finale di 0,2 mL di RPMI 1640 addizionato con il 10% di siero umano raggruppato (PHS). Dopo incubazione per una notte a 37°C i surnatanti sono stati raccolti e si è valutato il contenuto di citochine mediante ELISA (Endogen, Woburn, MA 01801, USA).

Saggio citotossico. La sensibilità di cellule bersaglio alla lisi è stata valutata con un saggio citotossico standard di rilascio di ^{51}Cr a diversi rapporti effettore: bersaglio (E:T). Il saggio di rilascio di ^{51}Cr è stato condotto

come descritto precedentemente (16).

Clonaggio di HLA-DRB1*01025 e DRB1*1001. I cloni di cDNA codificanti le catene HLA-DRB1*0102 e DRB1*1001 di pt15392 sono stati ottenuti con RT-PCR a partire da RNA poly(A)⁺ preparato da 15392LCL. L'amplificazione è stata effettuata usando primers specifici per le regioni conservate al 5' e 3' di catene di DRB1 (forward 5'-CGCGGATCCAGCATGGTGTGTCTG-3'; reverse 5'-GGAATTCCTCAGCTCAGGAATCCTGTT-3'), e i prodotti di PCR sono stati clonati in un vettore pcDNA3.1/V5-His TOPO (Invitrogen).

Costruzione e screening della libreria di cDNA derivata da tumore. RNA Poly(A)⁺ isolato da cellule Me15392 usando il kit FASTRACK (Invitrogen) è stato convertito in cDNA con Superscript Choise System (Life Technologies) usando un primer oligo(dT) [5'-pGACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCCC(T)₁₅-3'] contenente un sito XbaI (sottolineato). Il cDNA è stato legato ad adattatori EcoRI-BstXI (Stratagene), digerito con XbaI e inserito nei siti XbaI e BstXI del polylinker localizzato al terminale 3' dell'inserito di cDNA a catena invariante (Ii, aminoacidi 1-80) nel vettore di espressione pEAK8.5/Ii, creando così una libreria di cDNA di fusione derivata da tumore/Ii. Cellule di *E. Coli* DH5α sono state trasformate mediante elettroporazione con plasmidi ricombinanti e selezionate con ampicillina (0.1 g/litro). La libreria è stata divisa in 1400 gruppi di circa 100 cloni ricombinanti di cDNA ciascuno; i gruppi sono stati fatti crescere per una notte in terreno LB più ampicillina (0,1 g/litro), e il DNA plasmidico è stato estratto usando il kit QIAprep 96 plasmid (Quiagen).

Cellule CIITA⁺293 sono state seminate in micropozzetti da 96 a fondo

piatto (5×10^4 cellule per pozzetto) e sono state cotrasfettate con 150 ng di un gruppo della libreria di cDNA e 150 ng del plasmide contenente sia HLA-DRB1 sia HLA-DRB10, usando lipofectAMINE (Invitrogen). Dopo 24 ore il clone di CD4⁺T TB515 è stato aggiunto a ciascuna microcoltura a 1×10^4 cellule per pozzetto; 24 ore dopo, 100 μ L di surnatante sono stati raccolti e la produzione di INF- γ è stata misurata mediante saggio ELISA.

Costruzione e sequenziamento dei minigeni. Il sequenziamento di cDNA#11 è stato condotto con primers che mappano nelle regioni del vettore pEAK8.5/Ii fiancheggiante l'inserto (forward 5'-ACCTCGATTAGTTCTCGAGCTT-3', reverse 5'-ATTAGGACAAGGCTGGTGGGCACT-3'). La mutazione puntiforme non-conservativa (g→a) è stata confermata sia mediante sequenziamento di entrambi i filamenti del DNA di prodotti amplificati da RNA poly(A)⁺ di Me15392 retrotrascritto (primer forward F2 5'-GTGCTCCTATCAGTGCTTAT-3', primer reverse R2 5'-GCGTACGCACTGGGTTTT-3') sia dal DNA genomico di Me15392 (primer forward 5'-CTGCACCCACACCGAACCAAGAGAGAA-3', primer reverse 5-CGCCTGGAAATAGATGTTGTATCCTTT-3').

I minigeni sono stati preparati dal cDNA#11 come prodotti di amplificazione PCR di diversa lunghezza. Tutti gli ampliconi sono stati ottenuti dando lo stesso primer senso F2 accoppiato a quattro diversi primers antisenso: EPR1 5'-CCGATTGTCACCCACAGTGAA-3'-EPR2 5'-GGGCAGGCTCAGGTA-3', EPR3 5'-CTCGGGGGGAGTTCT-3', e EPR2WT 5'-GGGCAGGCTCAGGTAGGTTTCCCG-3'. Quest'ultimo è stato utilizzato per la preparazione del minigene EP2wt contenente il nucleotide

wild type (sottolineato nel primer EPR2WT). I prodotti di PCR sono stati clonati nel vettore pcDNA3.1/V5-Hits TOPO.

Il minigene di fusione li-EP2wt è stato ottenuto per rimozione del minigene EP2wt dal vettore TOPO con enzimi AscI e XbaI, e successivamente attraverso clonaggio dell'inserto nei siti AscI e XbaI del vettore pEAK8.5/li. Questa reazione ha generato un costrutto di fusione in fase.

Norther Blot ed analisi RT-PCR per l'espressione di R-PTPK. Gli RNA poly(A)⁺ di Me15392, i melanomi allogenicici e le linee PBL sono state isolate come descritto sopra. L'RNA totale è stato isolato usando il kit RNAqueousTM-4PCR (Ambion, Austin, TX, 78744, USA). Per gli esperimenti di Norther blot, 10 µg di ciascun campione di RNA sono stati sottoposti a elettroforesi in gel di agarosio formaldeide all'1% e trasferiti su membrana di nylon (Hybond-N⁺, Amersham Biosciences, Inc. Piscataway, NJ 08855-1327, USA). Le sonde sono state marcate con CTP[alfa-³²P] con il metodo del "random priming" (Amersham Biosciences), e la pre-ibridazione e ibridazione sono state condotte secondo le linee guida di Hybond-N⁺. Le membrane sono state lavate quattro volte con soluzioni diluite serialmente di SSC (da 0.03M a 0.0015M). Le sonde A e C sono state ottenute mediante amplificazione PCR dell'RNA poly(A)⁺ di Me15392 con primers specifici. La sonda A specifica per la regione 5' del gene (basi 241-1110 del gene), è stata sintetizzata con primers forward F1 (5'-GGCGCTGCCTGCTTTTGT-3') e reverse R1 (5'-GGAGGAGCAATGGGTCTT-3'). La sonda C, specifica per la regione codificante i due domini fosfatasi intracellulari (basi 2925-4547 del gene), è

stata ricavata dai primers forward F3 (5'-



CCTGGGATGTAGCTAAAAAAGATCAAATA-3') e reverse STOP (5'-CCAACTAAGATGATTCCAGGTACTCCAA-3'). Tutti i prodotti di amplificazione sono stati sequenziati prima di essere usati come sonde. Il DNA del clone#11 (basi 2084-2751 del gene) è stato usato come sonda B.

Le analisi di RT-PCR del profilo di espressione di PTPRK in linee cellulari normali e tumorali sono state condotte con il primer forward F3 e con i primer reverse R8 (5'-CACCTCTCTTTCAGCCAT-3') nelle seguenti condizioni: 2' 94°C, 34 cicli consistenti in 1' 94°C, 2' 54°C, 3' 72°C, e infine 10' 72°C. Le condizioni sono state stabilite in modo da ottenere un'amplificazione di DNA lineare. I DNA amplificati sono stati caricati su gel di agarosio, colorati con bromuro di etidio e analizzati con un software dedicato (Image Master VDL-CS, Amersham Pharmacia Biosciences). Le deviazioni standard erano $\leq 5\%$ in esperimenti triplicati. Il livello di espressione di ciascun campione è stato normalizzato per l'integrità dell'RNA tenendo in considerazione il livello di espressione del gene di β -actina (condizioni di reazione: 4' 94°C, 21 cicli consistenti in 1' 94°C, 2' 68°C, 2' 72°C, e infine 10' 72°C, corrispondente all'amplificazione del DNA lineare).

Sintesi dei peptidi. I peptidi sono stati sintetizzati mediante sintesi peptidica in fase solida convenzionale, usando Fmoc per la protezione transiente delle estremità di NH_2 , e caratterizzati con spettrometria di massa. Tutti i peptidi usati avevano purezza superiore al 95% (Neosystem, Strasbourg, France). I peptidi sono stati sciolti in DMSO a 5 mg/mL, conservati a -20°C , e diluiti in terreno RPMI addizionato con 10% di siero umano immediatamente prima dell'uso.

Saggio di ricostituzione dell'epitopo. Per analizzare il riconoscimento

del peptide, 5×10^3 cellule LCL15392 o LCL3700 sono state seminate in micropozzetti da 96 in 100 μ l di RPMI 1640-10% PHS e quindi pulsate con diverse concentrazioni del peptide in esame. Il caricamento del peptide è stato lasciato procedere per 2 ore a 37°C prima di aggiungere cellule effettrici a un rapporto E:T finale di 1:1.

I surnatanti sono stati raccolti dopo 18 ore e il contenuto di IFN- γ determinato con ELISA (Mabtech AB, Stockholm, Sweden). Esperimenti di competizione sono stati condotti incubando 5×10^3 LCL15392 o 5×10^3 LCL3700 con varie concentrazioni dei peptidi di competizione per 15 min prima dell'aggiunta del peptide PYYFAAELPPRNLPEP a 100nM. Dopo un'ora di ulteriore incubazione a 37°C, il clone di cellule T è stato aggiunto a un rapporto finale di 1:1.

Generazione di cellule T specifiche per PTPRK da PBMC di pt15392. I PBMC di pt15392 ottenuti 12 mesi dopo l'intervento chirurgico, nel periodo di follow up senza malattia, sono stati stimolati *in vitro* con il peptide PYYFAAELPPRNLPEP come precedentemente descritto (15). Brevemente, i PBMC (2×10^6 per pozzetto) sono stati stimolati settimanalmente con monociti autologhi pulsati con peptide. Al termine di ciascuna stimolazione la reattività peptide-specifica è stata monitorata con saggio Elispot.

Saggio IFN γ -Elispot. Piastre di microcellulosa da 96 pozzetti (Millititer, Millipore, Bedford, MA) sono state rivestite per una notte con 50 μ l per pozzetto dell'anticorpo monoclonale anti IFN- γ umano a 8 μ g/ml (Mabtech). I pozzetti sono stati quindi lavati e bloccati con Iscove's modified DMEM (BioWhittaker) e siero AB umano al 10% per 2 ore a 37°C. Le cellule

T (2×10^3 o 2×10^4) sono state miscelate con $1,5 \times 10^4$ cellule LCL autologhe e pulsate con peptide e poi seminate nei 96 pozzetti pre-rivestiti. Le cellule T incubate con il solo terreno o con mitogeno di fitolacca sono serviti come controlli negativo e rispettivamente positivo. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C e 5% CO_2 , Elispot è stato effettuato secondo le istruzioni del produttore. In breve le piastre sono state lavate sei volte con PBS + 0,05% Tween-20. I pozzetti sono stati incubati per 2 ore a 37°C con 50 μl per pozzetto di anticorpo monoclonale anti IFN- γ umano di topo biotinilato (Mabtech) a una concentrazione di 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Dopo quattro lavaggi con PBS, 100 μl di fosfatasi alcalina-streptavidina (150 $\mu\text{g/ml}$) diluita 1/1000 è stata aggiunta per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo un'ulteriore fase di lavaggio con PBS sono stati aggiunti 100 μl /pozzetto di substrato BCIP/NBT (BioRad, CA, 94547, USA) a ciascun pozzetto per 10-20 min. Lo sviluppo del colore è stato arrestato con lavaggio sotto acqua corrente di rubinetto. Dopo essiccamento a temperatura ambiente le cellule T secernenti IFN γ sono state contate usando il sistema di analisi di immagini automatico Elispot Reader (AID, Strassberg, Germany). Ciascun esperimento è stato condotto in triplo.

RISULTATI

Cloni di cellule TCD4⁺ tumore-specifici. 40 cloni di cellule TCD4⁺ tumore specifici (15392CD4⁺T) sono stati ottenuti per clonaggio con diluizione limitante di TIL isolati da una metastasi LN di pt15392, e stimolati *in vitro* con il tumore autologo per due settimane. L'analisi TCR mediante RT-PCR ha rivelato che tutti i cloni potevano essere raggruppati in cinque diversi sottogruppi secondo la combinazione di TCRAV e TCRBV (Tabella). Studi funzionali sono stati condotti su un singolo clone di cellule T

rappresentativo di ciascun sottogruppo. Si è trovato che tutti i cloni mostravano identica attività funzionale in risposta alla stimolazione da tumore. I dati riportati in figura 1 sono stati ottenuti con il clone TB515 e sono rappresentativi di tutti i cloni di cellule T testati. Dopo stimolazione con melanoma autologo, tutti i cloni esercitavano un'attività litica ristretta ad HLA-DR contro cellule Me15392, dato che la lisi rivelata con il saggio di rilascio di ^{51}Cr era inibita fortemente in presenza di L243, un mAb diretto contro un determinante monomorfo di HLA-DR (Figura 1A). A seguito di stimolazione con tumore i cloni di cellule T CD4^+ tumore-specifici rilasciavano anche un cocktail di citochine compatibile con il profilo Th1, tra cui $\text{INF-}\gamma$, GM-CSF, $\text{TNF-}\alpha$ e IL-2, ma non IL-4 e $\text{TGF}\beta$ (Figura 1B).

Il gene di PTPRK mutato codifica l'epitopo TB515. Grazie alla sua capacità di crescita *in vitro*, TB515 è stato selezionato e usato per caratterizzare molecularmente l'antigene specifico di melanoma. L'approccio genetico utilizzato a questo scopo è stato sviluppato come ottimizzazione di metodologie riportate di recente utilizzate per l'identificazione di antigeni tumorali (18-20). Le cellule 293-EBNA1 stabilmente trasfettate con il cDNA di CIITA (CIITA^+293) (21) sono state utilizzate come riceventi della libreria di cDNA tumorale. L'analisi FACS con Ab anti- HLA-DR ha rivelato un aumento significativo dell'espressione di HLA di classe II in cellule CIITA^+293 . Per forzare l'entrata delle proteine derivate da tumore nel cammino di processamento di HLA di classe II, migliorando così la sensibilità del metodo di screening, si è costruita una libreria chimerica di cDNA a catena invariante (Ii)/tumorale (22). La libreria di cDNA divisa in pools è stata quindi trasfettata in cellule CIITA^+293 insieme a 100 ng di plasmide



contenente gli alleli DRB1*0102 o DRB1*1001 clonati dallo stesso paziente.

Lo screening dei trasfettanti ha portato all'isolamento di un clone di cDNA positivo (cDNA#11) che veniva riconosciuto dalle cellule TB515 quando co-trasfettato in CIITA⁺293 con DRB1*1001 (CIITA⁺-DRB10⁺293) ma non quando co-trasfettato con l'allele DRB1*0102 (CIITA⁺-DRB1⁺293) (Figura 2A). Non si aveva riconoscimento quando il cDNA#11 e DRB1*1001 venivano cotrasfettati in 293 non modificate da CIITA (wt293), confermando ulteriormente la necessità di un macchinario di processamento HLA di classe II attivo per l'attivazione di TB515.

L'analisi di sequenziamento del DNA indicava che cDNA#11 era omologo a una regione parziale della Receptor-Like Protein-Tyrosine Phosphatase Kappa (*PTPRK*, GenBank NM_002844), una fosfatasi in tirosina di tipo II (PTP), che è una delle cinque sottofamiglie di PTP simili a recettori di transmembrana. Il cDNA#11 derivato da tumore si estendeva da 2084bp a 2751 bp della sequenza di cDNA pubblicata NM_002844, comprendendo la regione codificante il quarto dominio "C-most extracellular fibronectin III-like", il dominio transmembrana intero, e la sequenza intracellulare iniziale. Il clone presentava una mutazione puntiforme g→a non conservativa al nucleotide 2249 nel quarto dominio fibronectin III-like del gene (NM_002844), che portava ad una sostituzione Glicina-Arginina (G→R) nella corrispondente proteina. Per confermare che questa sostituzione amminoacidica non rappresentava un polimorfismo di singolo nucleotide, ma una mutazione somatica presente nel tessuto tumorale, si è amplificata la regione comprendente la mutazione e sequenziata a partire da cDNA ottenuto da PBL e LCL di pt15392. Nessuno dei campioni analizzati mostrava la

transizione g→a e solo la sequenza wild type è stata trovata. Inoltre, il DNA e il cDNA derivati da 10 linee cellulari di melanoma aggiuntive sono stati analizzati in modo simile ma nessuno di questi mostrava una mutazione del nucleotide 2249.

La sequenza della catena invariante non è necessaria per la presentazione dell'epitopo derivato da R-PTPK con HLA di classe II. L'analisi di sequenza del plasmide ricombinante contenente il cDNA del clone #11 ha rivelato che la traduzione della catena Ii veniva spostata rispetto alla fase corrispondente alla corretta traduzione della proteina PTPRK. Pertanto si è postulata l'esistenza nel plasmide ricombinante di una ulteriore fase di lettura aperta diretta da una ATG interna aggiuntiva. Analizzando la sequenza del cDNA#11, si è trovata una sequenza Kozak-like ((g/a)nnatgg) il cui ATG (posizione 2165 nella sequenza NM_002844 di GenBank) era in fase con la prima autentica metionina di partenza del gene del gene PTPRK. Per verificare la capacità di traduzione autosufficiente di questo codone ATG interno, il cDNA#11 è stato rimosso dal vettore pEAK8.5/Ii e inserito nel vettore di espressione mancante di Ii pcDNA3.1. Il nuovo plasmide ricombinante è stato quindi valutato per la capacità di scatenare l'attivazione di TB515 quanto trasfettato in cellule CIITA⁺293 insieme a DRB1*1001 (Figura 2B). Come atteso, il cDNA#11 clonato in assenza della catena Ii induceva rilascio di INF-γ da parte del clone TB515 in maniera specificamente ristretta a DRB1*1001. Il riconoscimento era efficiente come quello indotto dal cDNA#11 nel vettore pEAK8.5/Ii o dal tumore Me15392 (Figura 2B), indicando che in assenza del codone d'inizio di Ii, il cDNA#11 può essere tradotto dal proprio ATG interno e inoltre che il cDNA#11 può

essere processato naturalmente e presentato come tale attraverso una via HLA di classe II senza la necessità di un ridirezionamento intracellulare mediato dalla catena Ii.

Modelli di espressione dell'mRNA di RPTPK. Per ottenere maggiori informazioni circa gli specifici trascritti di RPTPK in Me15392 è stata condotta un'analisi di Northern blot (Figura 3). Per ricomprendere l'intero mRNA di PTPRK si è condotta un'ibridazione usando una miscela equimolare di tre specifiche sonde che mappavano in diverse regioni del gene PTPRK. I campioni esaminati comprendevano anche poly(A)⁺RNA di PBL, come controllo negativo dell'espressione di RPTPK, e la linea cellulare epidermica trasformata A431, come controllo positivo del trascritto "full-length", dato che questa linea cellulare notoriamente presenta alti livelli di espressione del gene PTPRK (24). I melanociti non potevano essere analizzati poiché non si era ottenuto sufficiente mRNA dalle cellule in crescita *in vitro*. Come atteso non si è osservata una banda di ibridazione significativa in PBL, confermando così i dati precedenti (24) mentre sia A431 che Me15392 poly(A)⁺RNA generavano un pattern piuttosto complesso (Figura 3A). Anche se specifiche bande aggiuntive erano chiaramente rilevabili intorno a 1800 bp e 1000 bp, entrambi i campioni presentavano un segnale intenso a circa 5600 bp corrispondente al trascritto full-length. Nell'insieme questi risultati indicano che Me15392 può esprimere una proteina PTPRK completa, mentre il significato biologico dei trascritti parziali di mRNA deve essere chiarito.

L'espressione dell'mRNA di PTPRK in altre cellule tumorali e non tumorali è stata studiata mediante RT-PCR. Le amplificazioni RT-PCR sono state effettuate da RNA totale usando la coppia di primer F3/R δ , che mappano

nel dominio intracellulare, "N most phosphatase" (lunghezza del prodotto di amplificazione 650 bp). I primers sono stati progettati per essere altamente specifici per il gene PTPRK. La loro specificità è stata confermata sperimentalmente e i prodotti di amplificazione ottenuti da diverse linee cellulari sono stati sequenziati e risultavano corrispondere solo a PTPRK, mentre non si sono trovate sequenze di altri geni R-PTP e PTP, neppure di quelli altamente omologhi a PTPRK. Le condizioni di reazione sono state stabilite in modo da avere amplificazioni di DNA lineari e si è utilizzata una quantità comparabile di mRNA per ciascuna linea cellulare come confermato dall'amplificazione di β -actina. Mentre PTPRK era chiaramente rilevabile nei melanociti (linea cellulare FM2093), la stessa proteina era variamente espressa in 10 linee di cellule di melanoma testate, 5 delle quali mostravano solo una banda appena rilevabile paragonabile a quella ottenuta da PBL che era negativa nell'analisi di Northern blot (Figura 3A). Alcuni esempi rappresentativi sono dati in Figura 3B.

Identificazione del peptide derivato da PTPRK ricostituente l'epitopo per TB515. Per valutare l'importanza della mutazione G→R nel riconoscimento delle cellule T una versione wild type (non mutata) del cDNA#11 è stata sintetizzata con reazione di PCR e co-trasfettata con DRB1*1001 cDNA in cellule CIITA⁺293. Non si è osservato riconoscimento della sequenza wild type da parte dei cloni TCD4⁺15392 tumore-specifici suggerendo così un ruolo diretto dell'amminoacido mutato nella formazione dell'epitopo. Per affinare ulteriormente la regione codificante l'epitopo del cDNA#11, si è sintetizzata una serie di minigeni con reazione di PCR di cDNA#11 usando un primer forward identico (F2) accoppiato a diversi



primers reverse "nested" mappanti a valle della mutazione (Figura 4). I minigeni, che contengono tutti il codone di inizio ATG del cDNA#11, sono stati clonati nel vettore di espressione pcDNA3/TOPO (Invitrogen), e poi trasfettati in CIITA⁺293 esprimenti sia DRB1*0102 che DRB1*1001, e infine valutati per il riconoscimento di TB515. Il minigene EP2 era il più corto costruito riconosciuto. Come atteso la versione wild type del minigene EP2 (EP2WT), ottenuta usando il primer reverse EPR2WT recante il nucleotide wild type (a/g mismatch) non era riconosciuta dai linfociti TB515 quando clonata nel vettore di espressione con o senza la catena invariante.

Questi esperimenti di trasfezione riducevano la regione aminoacidica potenzialmente immunogena a un peptide lungo 26 amminoacidi, mostrato in figura 4, contenente la mutazione. Per identificare l'epitopo TB515, sono stati sintetizzati diversi peptidi esadecameri sovrapposti che attraversano la regione di 26 amminoacidi identificata. I peptidi sono stati valutati a diverse dosi per la loro capacità di sensibilizzare *in vitro* cellule LCL autologhe al riconoscimento da parte del clone anti-melanoma TB515. Tra i peptidi esadecameri testati PYYFAAELPPRNLPEP (PTPRK₍₆₆₇₋₆₈₂₎), che si estende dall'amminoacido 667 a 682 della proteina e contiene la mutazione (figura 5, in grassetto), era quello che generava il maggior rilascio di INF- γ da parte del clone TB515. In effetti esperimenti di titolazione mostravano che questo peptide poteva essere rivelato da cellule TB515 a una concentrazione di 10nM, raggiungendo metà dell'effetto massimo a 100 nM (Figura 5A). La sostituzione nel peptide immunogeno del residuo di arginina mutato con la glicina wild type (Figura 5A) abrogava completamente la capacità stimolatoria, mostrando in definitiva l'importanza della mutazione per il

riconoscimento mediato da cellule T. Sono stati condotti ulteriori esperimenti con peptidi progressivamente privati di un residuo amminoacidico sia all'estremità 5' che 3' (Figura 5B e 5C) per identificare il nucleo minimo dell'epitopo e dei possibili amminoacidi di ancoraggio. In particolare l'eliminazione o la sostituzione con amminoacidi non rilevanti di Y₆₆₉ (Figura 5B) o L₆₇₉ e N₆₇₈ (Figura 5C) compromettevano fortemente la capacità del peptide PTPRK₍₆₆₇₋₆₈₂₎ di stimolare il clone TB515 suggerendo così un ruolo per questi amminoacidi in posizione 3, 11 e 12 nella formazione del complesso HLA-DR10/peptide/TCR. Il peptide wild type PYYFAAELPPGNLPEP e il PTPRK₍₆₆₇₋₆₈₂₎ con Y₆₆₉ sostituito da G erano entrambi in grado di legare HLA-DR10 dato che in un saggio di competizione inibivano efficientemente il riconoscimento del peptide PTPRK₍₆₆₇₋₆₈₂₎ da parte del clone TB515 (Figura 5D).

Gli altri 4 cloni di linfociti T descritti come aventi diversi TCR erano in effetti diretti contro lo stesso epitopo, non riconoscevano il peptide wild type e mostravano tutti una affinità per il peptide mutato simile a quella osservata per TB515. Inoltre il peptide PTPRK₍₆₆₇₋₆₈₂₎ recante una sostituzione al residuo Y₆₆₉ veniva efficientemente riconosciuto dal clone TB48 confermando che Y₆₆₉, pur essenziale per il riconoscimento mediato da TB515, non influenza in maniera cruciale la capacità di legame a HLA-DR10 del peptide PTPRK₍₆₆₇₋₆₈₂₎ (Figura 6).

Immunità sistemica sviluppata da Pt15392 contro l'epitopo di PTPRK presentato da HLA-DR10. Per stabilire se pt15392 sviluppava anche un'immunità cellulare epitopo-specifica sistemica i PBMC ottenuti 12 mesi dopo resezione chirurgica delle metastasi al linfonodo sono stati coltivati

in vitro con il peptide PYYFAELPPRNLPEP a 1 μ M. Dopo 3 settimane di stimolazione *in vitro* con i monociti autologhi pulsati con il peptide le cellule T coltivate mostravano reattività peptide-specifica determinata con il saggio Elispot, indicando la presenza nel sangue periferico di cellule T peptide specifiche (Figura 7). Queste cellule erano anche in grado di riconoscere il tumore autologo in modalità HLA-DR ristretta. Al contrario nessuna reattività specifica era rilevabile in PBMC ottenuti da donatori sani positivi per DRB1*1001.

Tabella

Caratterizzazione funzionale ed espressione di TCR di cloni CD4⁺T tumore-specifici.

^a Subset	^b Clone	^c TCRAV/TCRBV	Riconoscimento del tumore autologo			
			^d Lisi (%)		^e IFN- γ rilascio (pg/ml)	
T1	TB 515	13/21	50	(10)	1000	(200)
T2	TB 426	3/13	74	(35)	1200	(300)
T3	TB 48	3/21	35	(15)	1100	(200)
T4	TB 674	13/19	12	(5)	800	(100)
T5	TB 89	17/21	41	(10)	1060	(200)

^a Quaranta cloni di cellule T CD4⁺15392 anti-melanoma sono state generate per diluizione limitante di 15392CD4⁺TIL stimolati *in vitro* con il melanoma autologo per due settimane. I cloni 15392CD4⁺T sono stati raggruppati in 5 distinti subset (T1-T5) esprimenti diversi TCRAV e TCRBV.

^b Per ciascun subset è indicato un clone tumore-specifico, ulteriormente coltivato ed espanso *in vitro*.

^c Analisi di TCR è stata condotta con RT-PCR usando un pannello di

primer specifici per TCR V α e V β (si veda Materiali and Metodi).

^d La capacità dei cloni indicati di lisare il tumore autologo è stata testata in un saggio di rilascio di ⁵¹Cr per 5h a un rapporto E:T di 30:1. I dati sono riportati come % di lisi. I numeri in parentesi si riferiscono alla % di lisi ottenuta in presenza dell'anticorpo monoclonale anti-HLA-DR L343 usato a una concentrazione finale di 10 μ g/ml.

^e E' stato condotto un saggio di rilascio di citochine per valutare la capacità dei cloni di cellule T indicati di riconoscere il tumore autologo (si veda Materiali e Metodi). La quantità di IFN- γ rilasciato dopo stimolazione con tumore in assenza o in presenza (valori in parentesi) di L343 usato a una concentrazione finale di 10 μ g /ml, è espresso in pg/ml.



BIBLIOGRAFIA

1. Parmiani, G., Castelli, C., Dalerba, P., Mortarini, R., Rivoltini, L., Marincola, F.M., and Anichini, A. Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going? *JNCI*, 94: 805-818, 2002.
2. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., and Ferrone, S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv. Immunol.*, 74: 181-273, 2000.
3. Ossendorp, F., Toes, R.E., Offringa, R., van der Burg, S.H., and Melief, C.J. Importance of CD4(+) T helper cell responses in tumor immunity. *Immunol. Lett.*, 74: 75-79, 2000.
4. Kalams, S.A., and Walker, B.D. The critical need for CD4 help in maintaining effective cytotoxic T lymphocyte responses. *J.Exp. Med.*, 188: 2199-2204, 1998.
5. Overwijk, W.W., Lee, D.S., Surman, D.R., Irvine, K.R., Touloukian, C.E., Chan, C.C., Carroll, M.W., Moss, B., Rosenberg, S.A., and Restifo N.P. Vaccination with a recombinant vaccinia virus encoding a "self" ag induces autoimmune vitiligo and tumor cell destruction in mice: requirement for CD4(+) T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96: 2982-2987, 1999.
6. Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D., and Levitsky, H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.*, 188: 2357-2368, 1998.
7. van Bergen, J., Camps, M., Offringa, R., Melief, C.J., Ossendorp, F., and Koning, F. Superior tumor protection induced by a cellular vaccine carrying a tumor-specific T helper epitope by genetic exchange of the class II-

associated invariant chain peptide. *Cancer Res.*, 60: 6427-6433, 2000.

8. Ossendorp, F., Mengede, E., Camps, M., Filius, R., and Melief, C.J. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.*, 187: 693-702, 1998.
9. Toes, R.E., Schoenberger, S.P., van der Voort, E.I., Offringa, R., and Melief, C.J. CD40-CD40Ligand interactions and their role in cytotoxic T lymphocyte priming and anti-tumor immunity. *Semin. Immunol.*, 10: 443-448, 1998.
10. Cohen, P.A., Peng, L., Plautz, G.E., Kim, J.A., Weng, D.E., and Shu S. CD4+T cells in adoptive immunotherapy and the indirect mechanism of tumor rejection. *Crit. Rev. Immunol.*, 20: 17-56, 2000.
11. Lennon-Duménil, A. M., Bakker, A. H., Wolf-Bryant, P., Ploegh, H. L., and Lagaudrière-Gesbert, C. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 15-21, 2002.
12. Hiltbold, E.M., Roche, P.A. Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr. Opin. Immunol.*, 14: 30-35, 2002.
13. Wang, R.F. The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+T cells in antitumor immunity. *Trends Immunol.*, 22: 269-276, 2001.
14. Castelli, C., Tarsini, P., Mazzocchi, A., Rini, F., Rivoltini, L., Ravagnani, F., Gallino, F., Belli, F., and Parmiani, G. Novel HLA-Cw8-restricted T cell epitopes derived from tyrosinase-related protein-2 and gp100 melanoma antigens. *J. Immunol.*, 162: 1739-1748, 1999.
15. Castelli, C., Mazzocchi, A., Rini, F., Tarsini, P., Rivoltini, L., Maio, M., Gallino, G., Belli, F., and Parmiani, G. Immunogenicity of the

ALLAVGATK (gp100[17-25]) peptide in HLA-A3.1 melanoma patients. *Eur. J. Immunol.*, 28: 1143-1154, 1998.

16. Mazzocchi, A., Storkus, W.J., Traversari, C., Tarsini, P., Maeurer, M.J., Rivoltini, L., Vegetti, C., Belli, F., Anichini, A., Parmiani, G., and Castelli, C. Multiple melanoma-associated epitopes recognized by HLA-A3-restricted CTLs and shared by melanomas but not melanocytes. *J. Immunol.*, 157: 3030-3038, 1996.

17. Castelli, C., Mazzocchi, A., Salvi, S., Anichini, A., and Sensi, M. Use of the V delta 1 variable region in the functional T-cell receptor α chain of a WT31+ cytotoxic T lymphocyte clone which specifically recognizes HLA-A2 molecule. *Scand. J. Immunol.*, 35: 487-494, 1992.

18. Chiari, R., Hames, G., Stroobant, V., Texier, C., Maillère, B., Boon, T., and Coulie, P.G. Identification of a tumor-specific shared antigen derived from an Eph receptor and presented to CD4+T cells on HLA class II molecules. *Cancer Res.*, 60: 4855-4863, 2000.

19. Wang, R.F., Wang, X., and Rosenberg, S.A. Identification of a novel MHC class II restricted tumor antigen resulting from a chromosomal rearrangement recognized by CD4+T cells. *J. Exp. Med.*, 189: 1659-1668, 1999.

20. Wang, R.F., Wang, X., Atwood, A.C., Topalian, S.L., and Rosenberg, S.A. Cloning genes encoding MHC class II restricted antigens: mutated CDC27 as a tumor antigen. *Science*, 284: 1351-1354, 1999.

21. Sartoris, S., Valle, M.T., Barbaro, A.L., Tosi, G., Cestari, T., D'Agostino, A., Megiovanni, A.M., Manca, F., and Accolla, R.S. HLA class II expression in uninducible hepatocarcinoma cells after transfection of AIR-1

gene product CIITA: acquisition of antigen processing and presentation capacity. *J. Immunol.*, 161: 814-820, 1998.

22. Sanderson, S., Frauwirth, K., and Shastri N. Expression of endogenous peptide-major histocompatibility complex class II complexes derived from invariant chain-antigen fusion proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92: 7217-7221, 1995.

23. Zhang, Z.Y. Protein tyrosine phosphatases: structure and function, substrate specificity, and inhibitor development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 42: 209-234, 2002.

24. Yang, Y., Gil, M.C., Choi, E.Y., Park, S.H., Pyun, K.H., and Ha, H. Molecular cloning and chromosomal localization of a human gene homologous to the murine R-PTP-kappa, a receptor-type protein tyrosine phosphatase. *Gene*, 186: 77-82, 1997.

25. Fuchs, M., Muller, T., Lerch, M.M., and Ullrich, A. Association of human protein-tyrosine phosphatase kappa with members of the armadillo family. *J. Biol. Chem.*, 271: 16712-16719, 1996.

26. Neel, B.G., and Tonks, N.K. Protein-tyrosine phosphatases in signal transduction. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 9: 193-204, 1997.

27. Hunter, T. Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signalling. *Cell*, 80: 225-236, 1995.

28. Petrone, A., and Sap, J. Emerging issues in receptor protein tyrosine phosphatase function: lifting fog or simply shifting? *J. Cell. Sci.*, 113: 2345-2354, 2000.

29. Zondag, G.C., Koningstein, G.M., Jiang, Y.P., Sap, J., Moolenaar,

W.H., and Gebbink, M.F. Homophilic interactions mediated by receptor



tyrosine phosphatases mu and kappa. A critical role the novel extracellular MAM domain. *J. Biol. Chem.*, 270: 14247-14250, 1995.

30. Sap, J., Jiang, Y.P., Friedlander, D., Grumet, M., and Schlessinger, J. Protein Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates homophilic binding. *Mol. Cell. Biol.*, 14: 1-9, 1994.

31. Zhang, Y., Siebert, R., Matthiesen, P., Yang, Y., Ha, H., and Schlegelberger, B. Cytogenetical assignment and physical mapping of the human R-PTP-kappa gene (PTPRK) to the putative tumor suppressor gene region 6q22.2-q22.3. *Genomics*, 51: 309-311, 1998.

32. Guan, X.Y., Zhang, H.E., Zhou, H., Sham, J.S., Fung, J.M., and Trent, J.M. Characterization of a complex chromosome rearrangement involving 6q in a melanoma cell line by chromosome microdissection. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 134: 65-70, 2002.

33. Maitra, A., Gazdar, A.F., Moore, T.O., and Moore, A.Y. Loss of heterozygosity analysis of cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi: laser capture microdissection demonstrates clonal genetic changes in acquired nevocellular nevi. *Hum. Pathol.*, 33: 191-197, 2002.

34. McArdle, L., Rafferty, M., Maelandsmo, G.M., Bergin, O., Farr, C.J., Dervan, P.A., O'Loughlin, S., Herlyn, M., and Easty, D.J. Protein tyrosine phosphatase genes downregulated in melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 117: 1255-1260, 2001.

35. Robinson, J.H., and Delvig, A.A. Diversity in MHC class II antigen presentation. *Immunology*, 105: 252-262, 2002.

36. Wang, S., Bartido, S., Yang, G., Qin, J., Moroi, Y., Panageas, K.S., Lewis, J.J., and Houghton, A.N. A role for a melanosome transport signal in

accessing the MHC class II presentation pathway and in eliciting CD4+T cell responses. *J. Immunol.*, 163: 5820-5826, 1999.

37. Nisini, R., Paroli, M., Accapezzato, D., Bonino, F., Rosina, F., Santantonio, T., Sallusto, F., Amoroso, A., Houghton, M., and Barnaba, V. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J. Virol.*, 71: 2241-2251, 1997.

38. Hickling, J.K., Fenton, C.M., Howland, K., Marsh, S.G., and Rothbard, J.B. Peptides recognized by class I restricted T cells also bind to MHC class II molecules. *Int. Immunol.*, 2: 435-441, 1990.

39. Topalian, S.L., Gonzales, M.I., Parkhurst, M., Li, Y.F., Southwood, S., Sette, A., Rosenberg, S.A., and Robbins, P.F. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLA-DR-restricted tyrosinase epitopes. *J. Exp. Med.*, 183: 1965-1971, 1996.

40. Pieper, R., Christian, R.E., Gonzales, M.I., Nishimura, M.I., Gupta, G., Settlage, R.E., Shabanowitz, J., Rosenberg, S.A., Hunt, D.F., and Topalian, S.L. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4(+) T cells. *J. Exp. Med.*, 189: 757-766, 1999.

41. Yang, S., Linette, G. P., Longerich, S., and Haluska, F. G. Antimelanoma activity of CTL generated from peripheral blood mononuclear cells after stimulation with autologous dendritic cells pulsed with melanoma gp100 peptide G209-2M is correlated to TCR avidity. *J. Immunol.*, 169: 531-539, 2002.

42. Wang, H.Y., Zhou, J., Zhu, K., Riker, A.I., Marincola, F.M., and Wang, R.F. Identification of a mutated fibronectin as a tumor antigen recognized by

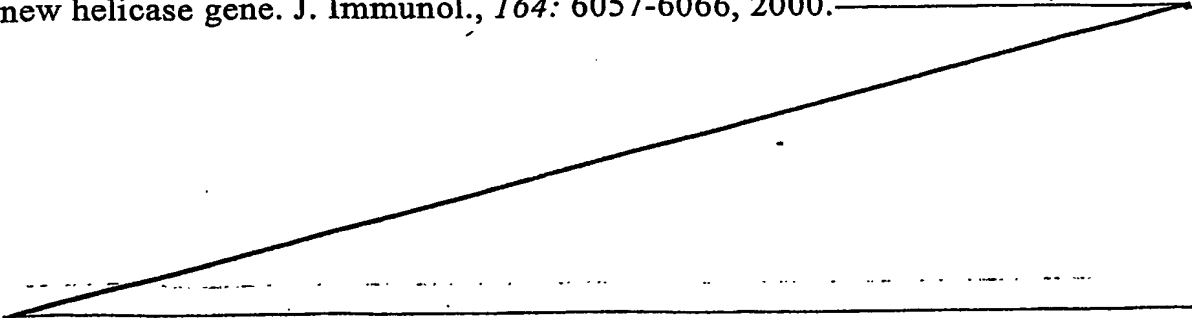
CD4+ T cells: its role extracellular matrix formation and tumor metastasis. *J. Exp. Med.*, 195: 1397-1406, 2002.

43. Wolfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wolfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Buschenfelde, K.H., and Beach, D. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*, 269: 1281-1284, 1995.

44. Robbins, P.F., El-Gamil, M., Li, Y.F., Kawakami, Y., Loftus, D., Appella, E., and Rosenberg, S.A. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 183:1185-1192, 1996.

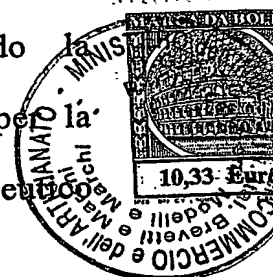
45. Karanikas, V., Colau, D., Baurain, J.F., Chiari, R., Thonnard, J., Gutierrez-Roelens, I., Goffinet, C., Van Schaftingen, E.V., Weynants, P., Boon, T., and Coulie, P.G. High frequency of cytolytic T lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen detectable with HLA tetramers in the blood of a lung carcinoma patient with long survival. *Cancer Res.*, 61: 3718-3724, 2001.

46. Baurain, J.F., Colau, D., van Baren, N., Landry, C., Martelange, V., Vikkula, M., Boon, T., and Coulie, P.G. High frequency of autologous anti-melanoma CTL directed against an antigen generated by a point mutation in a new helicase gene. *J. Immunol.*, 164: 6057-6066, 2000.



RIVENDICAZIONI

1. Peptide immunogeno di PTPRK_{Gly677→Arg} di sequenza SEQ ID N. 1.
2. Anticorpo monoclonale o policlonale, o suo frammento attivo, che riconosce selettivamente il peptide della rivendicazione 1.
3. Molecola di acido nucleico isolata codificante il peptide secondo la rivendicazione 1.
4. Vettore di espressione comprendente la molecola di acido nucleico secondo la rivendicazione 3 sotto il controllo di un promotore eterologo.
5. Cellula ospite contenente il vettore della rivendicazione 4.
6. Linfociti T CD4+ isolati in grado di riconoscere e legare il peptide SEQ ID N.1 associato ad una molecola HLA di classe II.
7. Linfociti T secondo la rivendicazione 6, in grado di riconoscere e legare detto peptide associato alla molecola HLA-DRβ1*1001.
8. Cellule presentanti l'antigene recanti il peptide SEQ ID N. 1 legato alla molecola HLA-DRβ1*1001.
9. Composizione farmaceutica contenente il peptide SEQ ID N. 1 o una molecola di acido nucleico codificante lo stesso insieme ad eccipienti farmaceuticamente accettabili.
10. Composizione secondo la rivendicazione 6, in forma di vaccino.
11. Uso del peptide SEQ ID N. 1, di una molecola di acido nucleico codificante lo stesso, di cellule presentanti l'antigene secondo la rivendicazione 8 o di linfociti T secondo le rivendicazioni 6-7, per la preparazione di un medicamento per il trattamento preventivo o terapeutico del tumore.
12. Uso secondo la rivendicazione 11, per il trattamento preventivo o



terapeutico di melanoma esprimente PTPRK Gly677→Arg.

13. Uso del peptide SEQ ID N. 1 o di una molecola di acido nucleico codificante lo stesso per la preparazione di una composizione diagnostica.

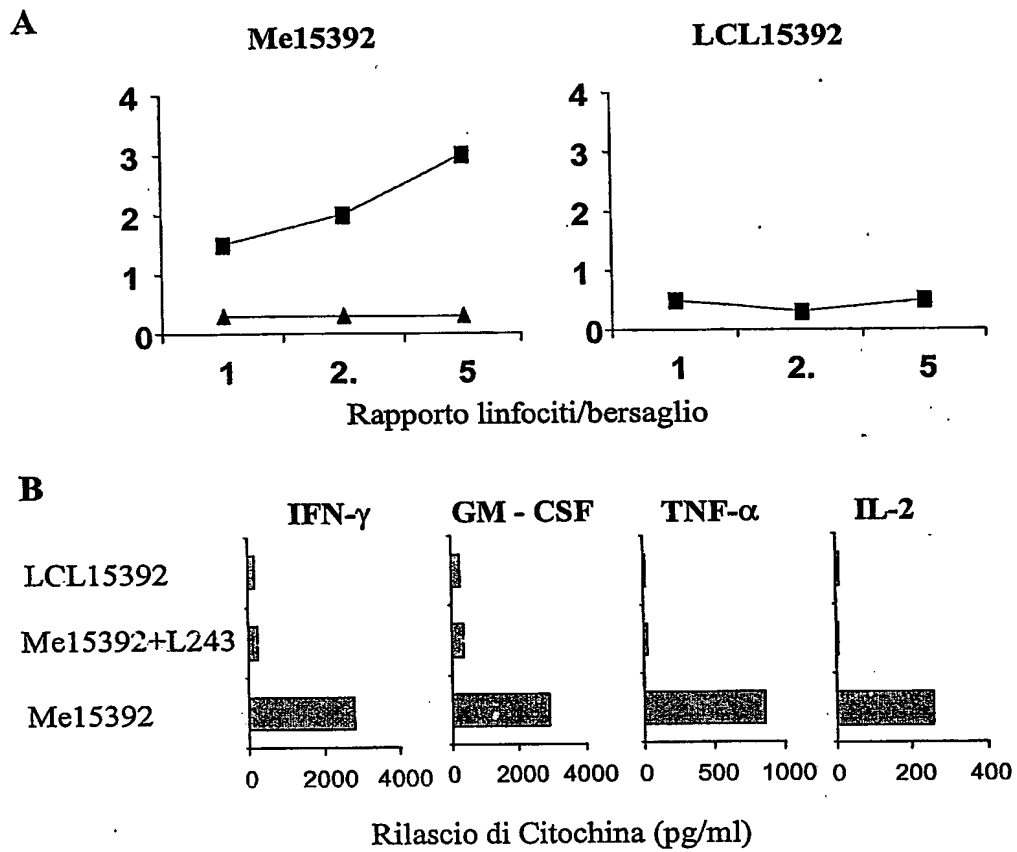
14. Uso secondo la rivendicazione 13, dove detta composizione diagnostica è utilizzata per la caratterizzazione di melanomi esprimenti PTPRK Gly677→Arg.

Milano, 14 novembre 2002

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.



FIGURA 1



MI 2002A 002412

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Handwritten signature



BEST AVAILABLE COPY

FIGURA 2

A

Cellule stimolatrici

CIITA⁺ 293

+ DRB1

+ DRB10

+ cDNA # 11

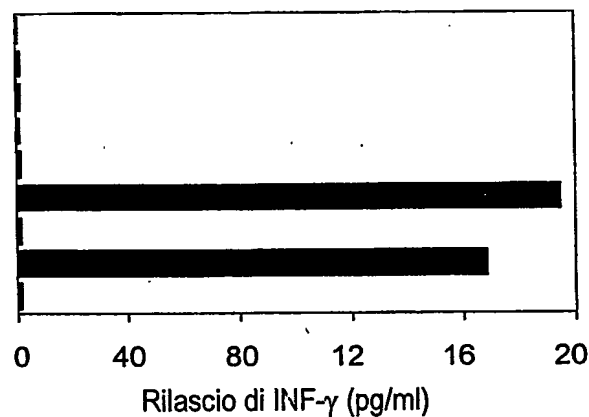
+ DRB1 + cDNA # 11

+ DRB10 + cDNA # 11

+ DRB10 + GFP

Me15392

wt293 + DRB10 + cDNA#11



B

Cellule stimolatrici

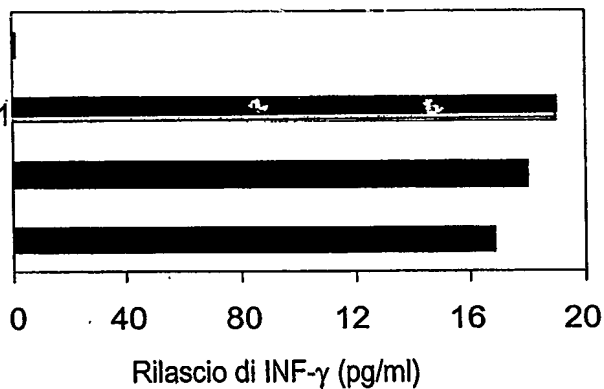
CIITA⁺ 293

+ cDNA # 11-pcDNA3.1

+ DRB10 + cDNA # 11-pcDNA3.1

+ DRB10 + cDNA # 11

Me15392



MI 2002A 002412

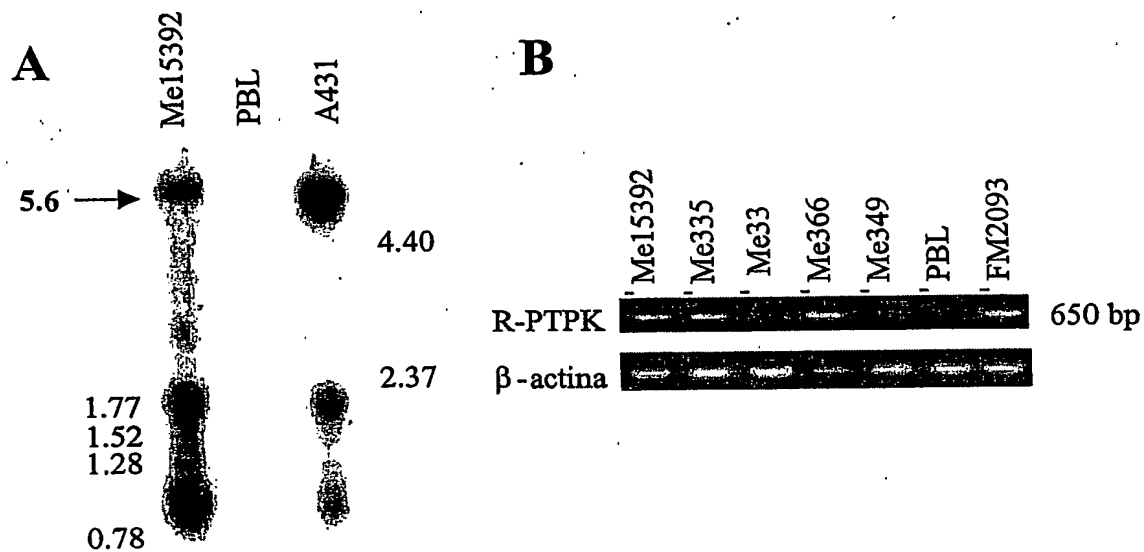
Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paolo Banfi



BEST AVAILABLE COPY

FIGURA 3



MI 2002A 002412

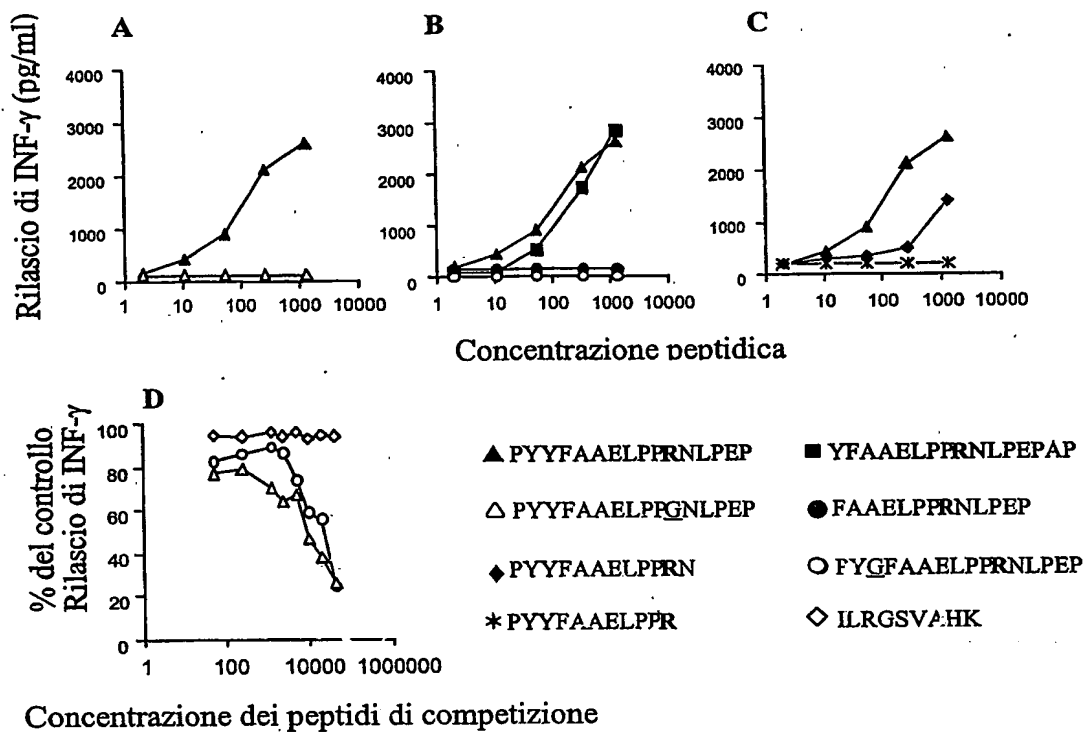
Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Paulo Banfi



BEST AVAILABLE COPY

FIGURA 5



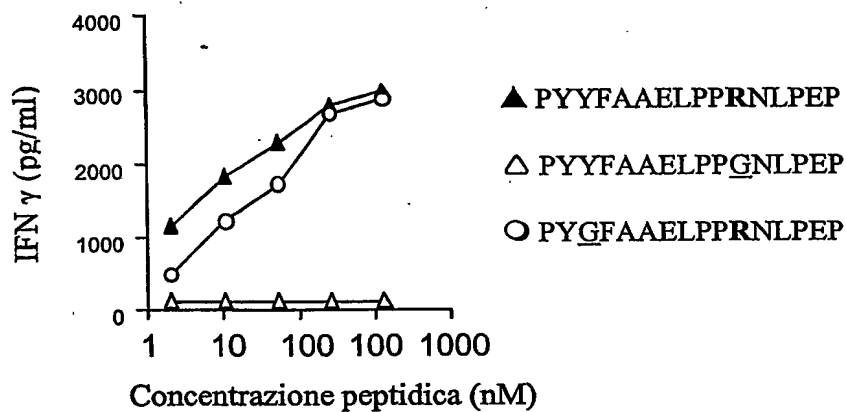
MI 2002A 002412

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Banfi Paolo



FIGURA 6



MI 2002A 002412

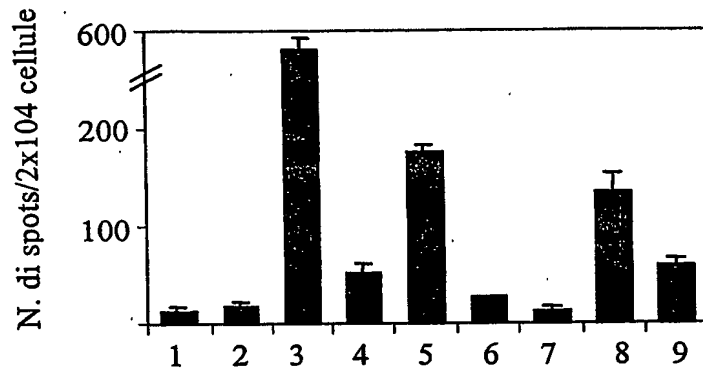
Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

PBB



BEST AVAILABLE COPY

FIGURA 7



MI 2002A 002412

Il Mandatario
(Banfi Paolo)
di Bianchetti Bracco Minoja S.r.l.

Banfi



BEST AVAILABLE COPY